



Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини
та біотехнологій імені С.З. Гжицького
Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and
Biotechnologies named after S.Z. Gzhytskyj

doi:10.15421/nvlvet6760

ISSN 2413–5550 print
ISSN 2518–1327 online

<http://nvlvet.com.ua/>

УДК 612.6. 636.082.4:591.31

Використання тривалого моніторингу розвитку ембріона (TLMED) в репродуктивній біотехнології

М.М. Шаран¹, С.Г. Шаловило², Х.М. Гримак¹
m_sharan@ukr.net

¹Інститут біології тварин НААН,
вул. В. Стуса, 38, м. Львів, 79034, Україна;

²Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького,
вул. Пекарська, 50, м. Львів, 79010, Україна

Сьогодні відзначається значне збільшення інтересу до допоміжних репродуктивних технологій. Робота з удосконалення процедур штучного запліднення призвела до створення таких методів, як ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection – внутрішньоклітинна ін'єкція спермія), IMSI (Morphologically Selected Intracytoplasmic Sperm Injection – внутрішньоклітинна ін'єкція морфологічно відібраного спермія) і генетичних досліджень на бластомерах, отриманих за допомогою біопсії ембріона. Останнім часом появилась нова технологія, яка дозволяє спостерігати за динамікою розвитку ембріонів з використанням тривалого моніторингу їх розвитку (TLMED – Time Lapse Monitoring of Embryo Development). З її допомогою можна успішно встановити правильні морфокінетичні параметри ембріона і з більшою точністю стежити за його розвитком. Сьогодні на ринку найширше використовують чотири системи: Primo Vision (Vitrolife, Швеція), EEVA (Aixogun, США), Embryoscope (Vitrolife, Швеція), MIRI (Esco, Данія), які проводять морфокінетичний аналіз ембріонів, що забезпечує відбір кращих ембріонів і підвищує результативність екстракорпорального запліднення. Перші позитивні результати використання системи TLMED у сільськогосподарській біотехнології на прикладі Центру медико-біологічних досліджень Варшавського природничого університету дозволяють прогнозувати проведення її у повсякденну практику ветеринарних клінік.

Ключові слова: тривалий моніторинг розвитку ембріона, морфокінетика, розвиток ембріона, допоміжні репродуктивні технології, біотехнологія розмноження тварин.

Использование длительного мониторинга развития эмбриона (TLMED) в репродуктивной биотехнологии

М.М. Шаран¹, С.Г. Шаловило², Х.Н. Грымак¹
m_sharan@ukr.net

¹Інститут биологии животных НААН,
ул. В. Стуса, 38, г. Львов, 79034, Украина;

²Львовский национальный университет ветеринарной медицины и биотехнологий имени С.З. Гжицкого,
ул. Пекарская, 50, г. Львов, 79010, Украина

Сегодня отмечается значительное увеличение интереса к вспомогательным репродуктивным технологиям. Работа по совершенствованию процедур искусственного оплодотворения привела к созданию таких методов, как ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection – внутриклеточная инъекция спермия), IMSI (Morphologically Selected Intracytoplasmic Sperm Injection – внутриклеточная инъекция морфологически отобранного спермия) и генетических исследований на бластомерах, полученных при помощи биопсии эмбриона. В последнее время появилась новая технология, которая позволяет наблюдать за динамикой развития эмбрионов с использованием длительного мониторинга их развития (TLMED – Time Lapse Monitoring of Embryo Development). С ее помощью можно успешно установить правильные морфокінетические па-

Citation:

Sharan, M., Shalovylo, S., Grymak, C. (2016). Using time lapse monitoring of embryo development (TLMED) in reproductive biotechnology. *Scientific Messenger LNUVMBT named after S.Z. Gzhytskyj*, 18, 2(67), 274–280.

раметры эмбриона и с большей точностью следит за его развитием. Сегодня на рынке широко используют четыре системы: Primo Vision (Vitrolife, Швеция), EEVA (Auxogyn, США), Embryoscope (Vitrolife, Швеция), MIRI (Esco, Дания), которые проводят морфокинетический анализ эмбрионов, что обеспечивает отбор лучших эмбрионов и повышает результативность экстракорпорального оплодотворения. Первые положительные результаты использования системы TLMED в сельскохозяйственной биотехнологии на примере Центра медико-биологических исследований Варшавского сельскохозяйственного университета позволяют прогнозировать внедрение ее в повседневную практику ветеринарных клиник.

Ключевые слова: длительный мониторинг развития эмбриона, морфокинетика, развитие эмбриона, вспомогательные репродуктивные технологии, биотехнология размножения животных.

Using time lapse monitoring of embryo development (TLMED) in reproductive biotechnology

M. Sharan¹, S. Shalovylo², C. Grymak¹
m_sharan@ukr.net

¹Institute of Animal Biology NAAS,
V. Stus Str., 38, Lviv, 79034, Ukraine;

²Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies named after S.Z. Gzhytskyi,
Pekarska Str., 50, Lviv, 79010, Ukraine

An increasing interest in assisted reproductive technologies and their applications in biotechnology of animal reproduction is currently observed. The development of in vitro fertilization (IVF) has led to the emergence of new techniques as ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection), IMSI (Morphologically Selected Intracytoplasmic Sperm Injection) and PGS (Pre-Implantation Genetic Screening). Recently a new technology TLMED (Time Lapse Monitoring of Embryo Development), which allows to observe dynamics of embryo development is being introduced to practice. The application of this technique allows to determine the morphokinetics parameters of normal embryos and to observe its development more accurately. Currently, there are four systems in the market based on this technique: Primo Vision (Vitrolife, Sweden), EEVA (Auxogyn, USA), Embryoscope (Vitrolife, Sweden), MIRI (Esco, Denmark), which conducting the morphokinetics analysis of embryos, which ensures selection of the best embryos and increases the effectiveness of in vitro fertilization. The first positive results of the use of system TLMED in agriculture biotechnology on the example of the Biomedical Research Center of the Warsaw University of Life Sciences predicts its introduction into the everyday practice of veterinary clinics. The aim of this paper is to present each system and review the existing information about the possible application of TLMED and the usefulness in animal reproductive biotechnology.

Key words: Time-Lapse, embryo, morphokinetics, assisted reproductive techniques, reproductive biotechnology.

Вступ

Прорив в ембріології відбувся 25 липня 1978 року, коли народилася Луїза Браун – перша дитина, отримана за допомогою процедури екстракорпорального запліднення (IVF – in vitro fertilization, запліднення поза організмом). Ця дата стала проривом в лікуванні безпліддя і призвела до появи нового відділу медицини – клінічної ембріології. З цього моменту почалося бурхливе зростання інтересу до методів штучного запліднення та їх застосування в репродуктивній медицині, головним чином в лікуванні безпліддя. Внаслідок цього відбувся швидкий розвиток техніки отримання ембріонів in vitro, в результаті чого створено багато спеціалізованих поживних середовищ, розроблено оптимальні умови для культивування ембріонів і впроваджено нові методи штучного запліднення, такі як ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection – внутрішньоклітинна ін'єкція спермія), IMSI (Morphologically Selected Intracytoplasmic Sperm Injection – внутрішньоклітинна ін'єкція морфологічно відібраного спермія) і генетичні дослідження на бластомерах, отриманих за допомогою біопсії ембріона.

Протягом декількох років на ринку з'явилася нова технологія, яка дозволяє спостерігати динаміку розвитку ембріонів з використанням тривалого моніторингу їх розвитку (TLMED – Time Lapse Monitoring of Embryo Development). Фотографування розвитку ембріонів з певною частотою, використовуючи вбудова-

ний в CO₂-інкубатор мікроскоп дозволяє отримувати зображення ембріона in vitro. Основною перевагою цього способу є його неінвазивність, оскільки ембріон протягом усього розвитку залишається в незмінних умовах інкубатора. До сих пір для того, щоб оцінити морфологію ембріона треба було витягнути його з інкубатора, що наражало його на зміни атмосфери і могло чинити істотний вплив на морфокінетичні параметри.

Перші літературні дані щодо морфокінетичного аналізу з використанням «покадрової кінематографії» виникла понад 15 років тому (Payne et al., 1997), але тільки в останні роки розвиток цифрових технологій дав можливість розробити ряд систем, які все частіше використовуються в клініках з лікування безпліддя для морфокінетичного аналізу ембріонів людини. Сьогодні появляються лише окремі літературні дані про використання цього методу в репродуктивній біотехнології тварин.

Метою цієї роботи є аналіз літературних джерел, що охоплює поточний стан використання цієї технології і її потенційне використання в біотехнології розмноження тварин.

Системи. Тривалий моніторинг розвитку ембріона використовувався ще в 90-х роках минулого століття для того, щоб спостерігати за процесом запліднення і кінетики ембріонів людини (Payne et al., 1997). Спочатку цей метод базувався на зйомці запліднених ооцитів щохвилини впродовж чотирьох годин за допомо-

гою фотокамери в інкубаційній камері на інвертованому мікроскопі. Удосконалення технології і створення інтегрованих систем дозволило візуалізувати весь розвиток ембріонів без необхідності виймати їх з інкубатора і підтримувати стабільні умови культивування з моменту запліднення яйцеклітини до трансплантації або заморожування (вітрифікації) ембріонів. На відміну від традиційних методів оцінки морфокінетичного розвитку ембріона щоденним спостереженням, метод TLMED дозволяє виконувати сотні фотографій, які дають можливість побачити ключові зміни в розвитку ембріона.

Значна кількість фотографій дозволяє створювати динамічний фільм, який відображає весь розвиток

ембріона. Найбільший інтерес у широкому впровадженні цієї технології з'явився в 2010 році після народження першої дитини, зачатої після екстракорпорального запліднення і культивування ембріонів в одній із систем моніторингу передімплантаційного розвитку.

З того часу розроблено кілька систем з використанням цієї технології. Їх основними компонентами є: камери з високою роздільною здатністю, вбудовані в інкубатор, що проводять зйомку, спеціальна чашка для культивування, яка запобігає переміщенню ембріонів і програмне забезпечення, яке дозволяє провести аналіз і обробку даних (рис. 1)

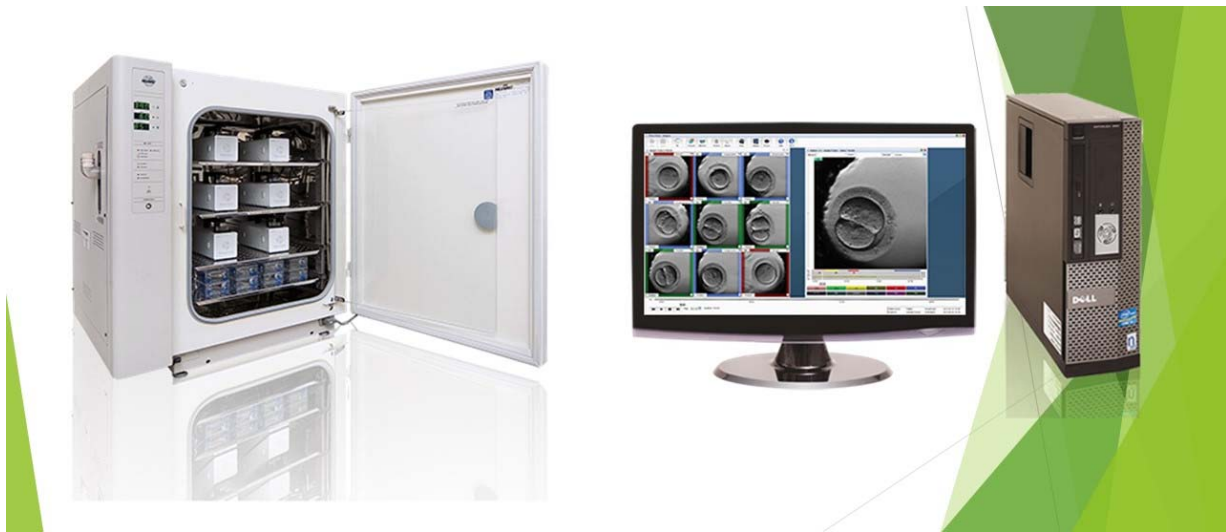


Рис. 1. Система тривалого моніторингу розвитку ембріонів

Серед доступних систем на ринку є деякі відмінності, але їх спільною рисою є ручна або напівавтоматична реєстрація подій, що відбуваються в процесі передімплантаційного розвитку ембріонів. Системи і програмне забезпечення розроблені таким чином, щоб вони могли адаптуватися до потреб користувачів. Вони можуть бути запрограмовані розпізнавати певні події, наприклад, поділ ембріонів або поява специфічних структур. Сьогодні на ринку найпопулярнішими є 4 конкуруючих системи.

Primo Vision (Vitrolife, Швеція). Система складається з камер з високою роздільною здатністю всередині класичного інкубатора для запліднення *in vitro*, які підключені до зовнішнього комп'ютера. Для кожного пацієнта є один мікроскоп. Залежно від розмірів інкубатора, він може помістити певну кількість мікроскопів. Блок Primo Vision Evo – це цифровий компактний інвертований мікроскоп з модуляційним контрастом Хоффмана (НМС) з зеленим світлом (550 нм), який може збирати зображення в 3–11 фокальних площинах. Повна система дозволяє підключати до 6 камер, що дає змогу досліджувати 96 ембріонів (Pribenszky et al., 2010).

Під час культивування чашка з матеріалом розташована статично під мікроскопом. Чашка виготовлена відповідно до вимог ЄС щодо безпеки, охорони здо-

ров'я та навколишнього середовища. Для культивування використовують два типи чашок: 9 лунок (3 ряди по 3 лунки) і 16 лунок (4 ряди по 4 лунки). Така конструкція чашки дозволяє проводити спільне культивування ембріонів і одночасно полегшує їх ідентифікацію, а доступ світла відбувається на поверхні розміром $2,5 \times 2,5$ мм. Конструкція чашки дозволяє оцінювати ембріони на нормальному або інвертованому стереоскопічному мікроскопі.

Програмне забезпечення Primo Vision дозволяє записувати зображення, аналіз яких потім виконується вручну. Виробник дозволяє налаштувати програмне забезпечення до вимог користувача введенням відповідних функцій, щоб забезпечити аналіз таких подій, як виштовхування полярного тіла, формування пронуклеусів або визначення тривалості інтервалів часу, що відбуваються між послідовними діленнями клітин. Можливість конфігурації модулів з різними типами інкубаторів забезпечує вибір оптимальних умов для вирощування та поліпшення існуючих протоколів культивування ембріонів.

EEVA (Auxogyn, США). Система EEVA (Early Embryo Viability Assessment – рання оцінка життєздатності ембріонів) також побудована з модулів у вигляді камер, які можуть бути поміщені в уже існуючий в лабораторії інкубатор. На відміну від Primo Vision,

яка використовує зелений фільтр і модуляційний контраст Хоффмана НМС, Система EEVA для отримання зображення використовує «темне поле» (DF – dark field). Ці дві системи відрізняє також застосування в EEVA єдиної фокальної площини і автоматичного відстеження поділу ембріона, яку Primo Vision проводить вручну. Програмне забезпечення, що входить в комплект, дозволяє проводити аналіз раннього розвитку ембріонів і надає дані про потенціал розвитку ембріонів до стадії бластоцисти, які розроблені на основі досліджень, проведених виробником (Wong et al., 2010).

Потенціал ембріона визначається за допомогою програмного забезпечення на основі аналізу його розвитку протягом двох днів після запліднення. Налаштування системи дозволяє спостерігати за ембріоном без участі ембріолога і впливу додаткового опромінення. Отримання кількісних даних, які корелюють зі стандартною класифікацією морфології ембріонів, дозволяє проводити точнішу їх селекцію вже на другий день розвитку. Таке вирішення, яке базується на автоматичній морфологічній і морфокінетичній оцінці, є набагато об'єктивнішим, ніж мануальна оцінка ембріолога. Програмне забезпечення аналізує події (час і місце), характерні для раннього ембріонального розвитку, воно включає:

- тривалість першого цитокінезу (час від початку першого поділу до його завершення);
- інтервал часу між першим і другим цитокінезом (час переходу від дво- до три-клітинної стадії);
- інтервал між другим і третім цитокінезом (час переходу від трьох- до чотирьох-клітинної стадії).

Завдяки використанню зазначених вище параметрів можна провести селекцію ембріонів для трансплантації чи заморожування (вітрифікації) вже на 3-ій день після запліднення без тривалого культивування, яке підвищує ризик виникнення епігенетичних факторів, які негативно впливають на якість ембріона (Shufaro and Laufer, 2013).

Чашки системи EEVA оснащені мікролунками, як і в Primo Vision і завдяки цьому можна ідентифікувати і оцінювати окремі ембріони, а період інкубації ембріони перебувають в умовах співкультивування. На одній чашці можна максимально розмістити 9 ембріонів.

Embryoscope (Vitrolife, Швеція). На відміну від вище наведених, Embryoscope є інтегрованою системою, що складається з інкубатора, в який можна вмістити максимум 6 пацієнтів (6 чашок). Це негігростатичний інкубатор, оснащений HEPA фільтрами і системою фільтрації летких органічних сполук, повітря всередині стерилізують ультрафіолетовим випромінюванням. Культивування в таких умовах зводить до мінімуму ризик розвитку грибів і бактерій. В інкубатор вбудована система камер з червоними світлодіодними лампами (635 нм), які дозволяють нагрівати до 9 рівновіддалених фокальних площин.

Чашка в інкубаторі складається з 12 лунок, у які можна розмістити по одному ембріону. Це дає можливість одночасно аналізувати розвиток 72 ембріонів. Чашка сконструйована так, щоб ідеально відповідала

робочому відділу і забезпечувала оптимальну передачу тепла в культуральне середовище.

Програмне забезпечення, що постачається виробником, дозволяє відбирати ембріони на основі ретроспективного аналізу. Записи можуть бути виконані одночасно в декількох інкубаторах і зібрані в одній центральній станції.

MIRI (Esco, Данія). Система MIRI аналогічно Embryoscope – це спеціалізований інкубатор, який складається з шести окремих камер, у кожній з яких можна одночасно культивувати до 14 ембріонів, поміщених в спеціально підготовлених чашках. Розмір камер і їх безпосередній нагрів дозволяє після відкриття дуже швидко стабілізувати температуру (менше 1 хвилини) Ця конструкція також дозволяє дуже швидко стабілізувати концентрацію газу, що займає близько 3 хвилин. Кожна камера обладнана в стандартній комплектації окремим датчиком температури і pH. Розвиток ембріонів контролюється в багатьох оптичних площинах з 5-хвилинними інтервалами. Програмне забезпечення дозволяє аналізувати ембріональний розвиток як в реальному часі, так і в ретроспективі.

Клінічні аспекти.

Сьогодні, щоб встановити імплантаційний потенціал ембріона, отриманий заплідненням *in vitro*, використовують морфокінетичну оцінку, яка досить добре задокументована і корелює з потенціалом розвитку ембріона. Ця оцінка зазвичай проводиться щодня протягом очікуваної події (наприклад, поява пронуклеуса, перший поділ тощо) протягом 6 – 8 днів ембріонального розвитку до моменту досягнення стадії бластоцисти, або навіть до вилуплення бластоцисти.

На сьогоднішній день більшість досліджень проводять на людських ембріонах. На підставі визначення кількості клітин, їх форми і зовнішнього вигляду кожного дня, фрагментації і наявності мультиплексації в бластомерах створено кілька систем оцінки розвитку ембріона, наприклад, система оцінки, запропонована British Fertility Society і Association of Clinical Embryologists, які використовуються у Великобританії (Cutting et al., 2008). Є також більш розширені системи, які беруть до уваги додаткові чинники, наприклад, оцінку кількості і розподіл ядерець в пронуклеусі (Fisch et al., 2010).

Новітньою та найбільш поширеною системою оцінки ембріонів, що дозволяє її стандартизацію, є «Стамбульський консенсус» розроблений Європейським товариством репродукції людини і ембріології (ESHRE – European Society of Human Reproduction and Embryology) і ALPHA – Scientists in Reproductive Medicine, в якому представлені морфологічні критерії, на підставі яких можна оцінити якість ооцитів і ембріонів. Вибір ембріона з кращими морфологічними параметрами має вирішальне значення, оскільки, як показують дослідження, досягнення певної стадії в часі корелює з життєздатністю ембріона і його потенціалом для розвитку та імплантації.

Слабким місцем існуючих систем оцінки є проведення щоденного аналізу, що вимагає піддавання ембріона впливу умов навколишнього середовища під час відкривання інкубатора. Крім того, в результаті

одного спостереження отримується обмежена інформація про розвиток ембріона. Сьогодні все більшу увагу приділяють оцінці морфокінетичного розвитку ембріона (динаміка морфологічного розвитку).

Такі спостереження можливі завдяки впровадженню технології покадрової візуалізації. Значне зростання відсотка вагітності (на 20%) після застосування методики TLMED отримано за використання системи Embryo Score M. Meseguer'a (Meseguer et al., 2012). Такі результати зумовлені перебуванням ембріонів впродовж усього періоду культивування в стабільних умовах в інкубаторі, а також можливістю детального аналізу їх морфокінетики. Прикладом можуть служити типові порушення в поділі з дво- до триклітинної стадії. У ембріонів, в яких спостерігали, що перехід від стадії двох до трьох бластомерів відбувається менш ніж за 5 годин, виявився менший імплантаційний потенціал. Для нормальних ембріонів клітинний цикл становить 10 – 12 годин (Rubio et al., 2012). Це доводить, що за «класичного» методу оцінки ембріонів таких спостережень неможливо було б здійснити.

У клінічній практиці існує безліч варіантів застосування системи TLMED, починаючи з перевірки звичайного «статичного» аналізу розвитку. Ця технологія також дозволяє прогнозувати життєздатність ембріонів, щоб порівняти вплив таких факторів, як культуральне середовище або добавки до нього. Залежно від характеру добавки або дози, отримані результати розвитку ембріонів відрізняються один від одного, а система TLMED дозволяє точно встановити ці відмінності.

Селекція морфокінетичних маркерів.

Тривалий моніторинг динаміки розвитку ембріона в поєднанні з використанням класичного морфологічного спостереження дозволяє отримати детальні морфокінетичні дані. Отримання інформації можливе завдяки ретроспективному аналізу подій в певний час, які потім можна скорелювати з процесом бластуляції, відсотком імплантації, ступенем плоідності, вагітністю і родами. Спостереження за розвитком ембріона дозволяє вибрати оптимальні морфокінетичні маркери для конкретного виду, а також отримання найкращих результатів завдяки селекції нормальних ембріонів.

Перша модель оцінки ембріонів на основі їх морфокінетики була створена в 2010 році (Wong et al., 2010). До тих пір процес оцінки бластуляції вважався маркером якості і життєздатності ембріонів. З впровадженням технології TLMED вона була поширена також як маркер, що дозволяє передбачити ступінь плоідності, потенціал для імплантації або збільшити відсоток вагітностей (Herrero et al., 2010; Cruz et al., 2011; Meseguer et al., 2011; Leibenthron et al., 2012; Chamayou et al., 2013; Campbell et al., 2013).

Дослідженнями, які базуються на ретроспективному аналізі, виявлено 6 морфокінетичних маркерів, які корелюють з імплантаційним потенціалом (Meseguer et al., 2011). Найважливішим визнано час досягнення п'ятиклітинної стадії (t5) і тривалість другого циклу (cc2). Авторами представлені критерії, які чинять негативний вплив на імплантацію. До них відно-

сяться: безпосередній поділ від одно- до триклітинної стадії, нерівні бластомери і мультиноклеація на стадії чотирьох бластомерів. Порівняно недавно встановлено взаємозв'язок між морфокінетичними параметрами і ступенем плоідності ембріона. З цією метою проведено біопсію бластомерів ембріонів і їх передімплантаційні генетичні дослідження, а потім результати порівнювали з даними, отриманими з використанням методу TLMED. Виявилося, що єдиними маркерами ступеня плоідності є час початку бластуляції (tSB) і час досягнення стадії зрілої бластоцисти (tB). На цій підставі визначено ризик анеуплоїдії (Campbell et al., 2013). Інша група вчених на основі аналогічних припущень розробила метод селекції еуплоїдних ембріонів (з повним набором хромосом). Вони відзначили, що морфокінетична характеристика ембріонів з повним набором хромосом, відрізняється від тих, у яких порушена кількість хромосом. Спостерігалися істотні відмінності між стадіями t5–t2 і у третьому клітинному циклі (cc3 = t5–t3) (Basile, 2014).

На додаток до перерахованих вище факторів, кінцевий результат процедури запліднення *in vitro*, тобто народження здорової дитини залежить від багатьох чинників. Таким чином, вважається, що найкращим є той ембріон, після трансплантації якого отримано вагітність і народилася дитина. Ще й досі мало експериментів зосереджені на такому підході, і тому це вимагає додаткових досліджень. В одному з експериментів порівнювали морфокінетичні параметри ембріонів, після трансплантації яких отримали потомство ембріонів, аборти або відсутність вагітності. Проведене дослідження показало, що отримання вагітності і народження дитини тісно пов'язане з часом появи першого поділу і тривалістю раннього клітинного циклу. Проте, проводиться мало досліджень цього параметра, і це питання в перспективі необхідно розробити (Campbell et al., 2013).

Крім вищевказаних морфокінетичних маркерів існує ряд інших параметрів, які можна спостерігати в ході розвитку ембріона за допомогою техніки TLMED (табл.).

Незважаючи на існування численних моделей, заснованих на покадровому аналізі розвитку ембріона необхідно пам'ятати, що багато з них не можуть бути безпосередньо впроваджені в будь-якій лабораторії через інші чинники, які впливають на морфокінетику. До таких чинників можуть належати, зокрема, тиск газів в інкубаторі або тип культурального середовища. Встановлено, що умови культивування ембріонів мають подібний вплив на їх морфокінетику, як вік і вага пацієнтки (Ciray et al., 2012; Leibenthron et al., 2012; Bellver et al., 2013; Dąbrowski et al., 2015). Крім того, більшість попередніх досліджень зосереджено на аналізі морфокінетики ембріонів і її впливі на бластуляцію, плоідність, вагітність і роди. Багато з них також аналізували події, що відбуваються під час розвитку до стадії 5 бластомерів. Знання морфокінетики ембріонів після п'ятиклітинної стадії вимагають подальших досліджень і аналізу.

Морфокінетичні параметри розвитку ембріона

	Символ параметра	Опис параметра
Час настання параметра	t ₀	Час запліднення яйцеклітини
	tPB2	Час повного виходу другого полярного тільца з ооплазми
	t ₁ PN	Час появи двох пронуклеусів – підтвердження запліднення
	(tPN1a)	Час появи першого пронуклеуса
	(tPN2a)	Час появи другого пронуклеуса
	tPNf	Час злиття двох пронуклеусів
	t ₂ –t ₉	Час досягнення стадії від двох до дев'яти клітин
	tsc	Час ініціювання компактизації (ущільнення)
	tMx/w	Час формування морули або зупинки ущільнення: «x» – відповідає повному ущільненню, «w» – відповідає частковому ущільненню
	tSB	Час появи порожнини – початок бластуляції
	tByz	Час досягнення стадії зрілої бластоцисти. «y» – відповідає морфології клітин зародкового вузла, «z» – відповідає морфології клітин трофоектодерми
	tEyz	Час ініціації вилуплення бластоцисти – прозора оболонка стає щораз тонша
	tHNyz	Час виходу клітин за межі прозорої оболонки
	tHDyz	Час досягнення стадії вилупленої бластоцисти
Розраховані параметри	VP = tPNf–tPN1a	Період, в якому видно пронуклеус
	CC1 = t ₂ –tPB2	Тривалість першого клітинного циклу: період від кінця другого мейотичного поділу до досягнення двоклітинної стадії
	CC2	Тривалість другого клітинного циклу: час між дво- і чотириклітинними стадіями, час утворення двох наступних бластомерів можна розглядати окремо відповідно до формули: CC2a = t ₃ – t ₂ CC2b = t ₄ – t ₃
	CC ₃	Тривалість третього клітинного циклу: час між чотири- і восьмиклітинними стадіями, час утворення чотирьох наступних бластомерів можна розглядати окремо відповідно до формули: CC3a = t ₅ – t ₄ CC3b = t ₆ – t ₅ CC3c = t ₇ – t ₆ CC3d = t ₈ – t ₇
	S2 = t ₄ – t ₃	Час переходу двох сестринських клітин, під час якого обидві поділяються до чотириклітинної стадії.
	S ₃ = t ₅ – t ₄	Час переходу чотирьох сестринських клітин, під час якого всі поділяються до восьмиклітинної стадії
	tMx – tSC	Час досягнення повної компактизації
	tMy – tSC	Час досягнення часткової компактизації
	tHN–tSB	Тривалість бластуляції

Перспектива використання методу *TLMED* у ветеринарній практиці.

Технологія *TLMED* все частіше використовується в клінічній ембріології людини. Численними працями були документально підтверджено, що його впровадження сприяє підвищенню відсотка вагітностей і дозволяє стандартизувати оцінку морфокінетичного розвитку ембріона. Існуючі системи дозволяють вибрати оптимальну конфігурацію апаратних засобів для цілей, відповідних конкретним лабораторним умовам.

До сих пір тривалий моніторинг розвитку ембріонів не використовувався в основному у людей і тільки незначні роботи проводяться на тваринах. Впровадження технології *TLMED* у ветеринарних клініках, що займаються репродуктивною біотехнологією як малих, так і великих тварин дозволило б поліпшити результати. З іншого боку, впровадження цієї технології і її застосування в біотехнології племінних тварин вимагає багато роботи через необхідність розробки моделей морфокінетичного розвитку ембріонів для кожного виду. Проте, задокументована ефективність технології *TLMED* людей сприятиме в найближчому майбутньому підвищенню інтересу фахівців з репродуктивної біотехнології у використанні цього методу на тваринах. Створюється враження, що впроваджен-

ня цього методу у практику ветеринарних клінік може бути тільки питанням часу.

Підтвердженням цього є відкриття у Варшавському природничому університеті Центру медико-біологічних досліджень, у складі якого запрацювала лабораторія біотехнології, де активно розпочали дослідження із запліднення ооцитів *in vitro* використанням внутрішньоклітинної ін'єкції морфологічно відібраного спермія (IMSI) та тривалого моніторингу розвитку ембріонів (*TLMED*) різних видів тварин (мишей, кролів, собак, овець; рис. 2) (Dąbrowski et al., 2015).

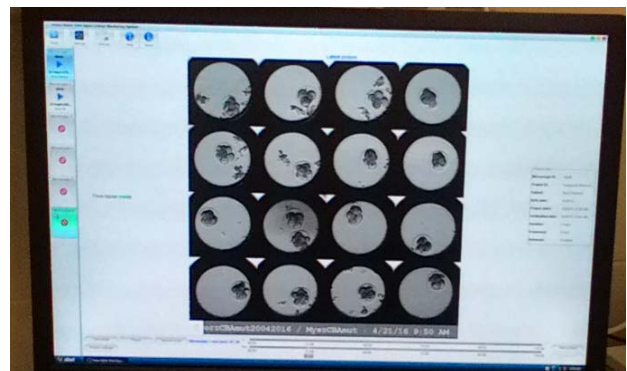


Рис. 2. Тривалий моніторинг розвитку ембріонів (*TLMED*) мишей

Отримані позитивні результати вселяють надію на широке використання у провідних наукових центрах аграрного профілю методу тривалого моніторингу розвитку ембріонів, що дозволить підвищити результативність *in vitro* запліднення ооцитів і впровадити у практику тваринництва.

Висновки

Розвиток цифрових та біотехнологій дав можливість розробити системи тривалого моніторингу розвитку ембріонів (TLMED), які широко використовуються в клініках з лікування безпліддя людей. Сьогодні на ринку найширше використовують чотири системи: Primo Vision (Vitrolife, Швеція), EEVA (Аухогун, США), Embryoscope (Vitrolife, Швеція), MIRI (Esco, Данія), які проводять морфокінетичний аналіз ембріонів, що забезпечує відбір кращих ембріонів і підвищує результативність екстракорпорального запліднення. Перші позитивні результати використання системи TLMED у сільськогосподарській біотехнології дозволяють прогнозувати впровадження її у повсякденну практику ветеринарних клінік.

Перспективи подальших досліджень. Дослідження з використання системи TLMED у сільськогосподарській біотехнології дозволять розробити моделі морфокінетичного розвитку ембріонів для кожного виду тварин, що дасть можливість впровадити метод тривалого моніторингу розвитку ембріонів у біотехнологію відтворення племінних тварин.

Бібліографічні посилання

- Payne, D., Flaherty, S.P., Barry, M.F., Matthews C.D. (1997). Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum. Reprod.* 12, 532–541.
- Pribenszky, C., Matyas, S., Kovacs, P. (2010). Pregnancy achieved by transfer of a single blastocyst selected by time-lapse monitoring. *Reprod. Biomed Online.* 21, 533–536.
- Wong, C.C., Loewke, K.E., Bossert, N.L. (2010). Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat. Biotechnol.* 28(10), 1115–1121.
- Shufaro, Y., Laufer, N. (2013). Epigenetic concerns in assisted reproduction: update and critical review of the current literature. *Fertil. Steril.* 99(3), 605–606.
- Cutting, R., Morroll, D., Roberts, S.A. (2008). Elective single embryo transfer for practice. *British Fertility Society and Association of Clinical Embryologists.* *Hum. Fertil.* 11(3), 131–146.
- Fisch, J., Rodriguez, H., Ross, R. (2001). The graduated embryo score predicts blastocyst formation and pregnancy rate from cleavage stage embryos. *Hum. Reprod.* 16, 1970–1975.
- Meseguer, M., Rubio, I., Cruz, C. (2012). Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: a retrospective cohort study. *Fertil. Steril.* 98(6), 1481–1489.
- Rubio, I., Kuhlmann, R., Agerholm, I. (2012). Limited implantation success of direct-cleaved human zygotes: a time-lapse study. *Fertil. Steril.* 98(6), 1458–1463.
- Wong, C.C., Loewke, K.E., Bossert, N.L. (2010). Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat. Biotechnol.* 28(10), 1115–1121.
- Meseguer, M., Herrero, J., Tejera, A. (2011). The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum. Reprod.* 26(10), 2658–2671.
- Campbell, A., Fishel, S., Bowman, N. (2013). Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics. *Reprod. BioMed Online.* 26(5), 477–485.
- Campbell, A., Fishel, S., Bowman, N. (2013). Retrospective analysis of outcome after using an aneuploidy risk model derived from time-lapse imaging without PCS. *Reprod. Biomed. Online.* 27(10), 140–146.
- Herrero, J., Alberto, T., Ramsing, N.B. (2010). Unking successful implantation with the exact timing of cell division events obtained by time-lapse system in the EmbryoScope. *Fertil. Steril.* 94(4), 149.
- Cruz, M., Perez-Cano, I., Cadea, B. (2011). Time-lapse video analysis provides a correlation between early embryo division kinetics and subsequent blastocyst formation and quality. *Hum. Reprod.* 26, 115.
- Chamayou, S., Patrizio, P., Storaci, C. (2013). The use of morphokinetic parameters to select all embryos with full capacity to implant. *J. Assist. Reprod. Genet.* 30, 703–710.
- Campbell, A., Fishel, S., Duffy, S. (2013). Embryo selection model defined using morphokinetic data from human embryos to predict implantation and live birth. *ASRM.* 24, 1228.
- Basile, N. (2014). Increasing the probability of selecting chromosomally normal embryos by time-lapse morphokinetics analysis. *Fertil. Steril.* 101(3), 699–704.
- Leibenthron, J., Montag, M., Koster, M. (2012). Influence of age and AMH on early embryo development realised by time-lapse imaging. *Hum. Reprod.* 27, 135.
- Bellver, J., Mifsud, A., Crau, N. (2013). Similar morphokinetic patterns in embryos derived from obese and normoweight infertile women: a time-lapse study. *Hum Reprod.* 28(3), 794–800.
- Ciray, H.N., Aksoy, T., Coktas, C. (2012). Time-lapse evaluation of human embryo development in single versus sequential culture media – a sibling oocyte study. *J. Assist. Reprod. Genet.* 29(9), 891–900.
- Dąbrowski, S., Faundez, R., Petraitis-Golobus, M., Gajewski, Z. (2015). Poklatkowa analiza rozwoju zarodka; zastosowanie w biotechnologii rozrodu. *Rozrod i mastitis u bydla.* Warszawa, 6–13.

Стаття надійшла до редакції 28.09.2016